

토양미생물군집의 개체수와 활성도에 미치는 경유의 영향

서은영 · 송홍규*

강원대학교 자연과학대학 미생물학과

경유를 sandy loam 토양에 농도별로 투여하여 토양미생물군집에 미치는 영향을 조사하였으며 또한 경유가 첨가된 토양에서 경유의 신속한 제거를 위해 실시한 bioremediation에 의한 영향을 측정하였다. 경유는 토양에서 16주 후 약 50% 내외의 잔류량을 나타내며 bioremediation 처리시 제거율은 60~95% 정도가 증가하여 16주 후 약 8~20% 범위의 잔류량을 나타냈다. 토양에 경유가 첨가되었을 때에는 세균직접계수, 진균류의 균사 길이, 호기성 종속영양세균과 탄화수소 분해세균의 수가 최고 10 내지 100배 정도 증가하였다. Bioremediation 처리시에는 그 증가가 더욱 두드러져 각종 미생물 개체수 측정치가 최고 100배 내지 1000배까지 증가하였다. 경유가 fluorescein diacetate 가수분해 활성에 미치는 영향은 bioremediation 처리를 하지않은 토양에서는 뚜렷한 증감의 경향이 없었으나 bioremediation 처리를 한 토양에서는 10배 내외의 활성의 증가를 보였으며 이러한 양상은 soil dehydrogenase 활성에서도 유사하게 나타났다.

KEY WORDS □ diesel oil, bioremediation, soil microbial community, microbial population, microbial activity.

전세계적으로 석유탄화수소(petroleum hydrocarbon, PHC)는 가공과 산업에서 널리 사용되고 있다. 그러나 많은 양의 원유 또는 정제된 석유제품들이 생산, 운반, 저장 등의 과정에서 우발적으로 또는 고의적으로 자연환경에 유출되고 있다. PHC가 토양에 유입되었을 때에는 물에서와는 달리 비교적 소량만이 대기중으로 증발되며 많은 양이 지하로 침투하여 높은 농도로 토양에 잔류하게 된다. 이렇게 토양에 유입된 석유탄화수소는 토양미생물군집의 크기와 조성 및 활성을 변화시키는데 PHC가 매우 많은 종류의 탄화수소화합물의 복합체이므로 그 영향은 PHC의 화학적 조성과 농도, 존재하는 미생물종과 생태계의 성질 및 환경조건의 변화 등에 따라 달라질 수 있다. 오염물질의 유입에 의한 미생물군집의 크기, 종조성, 다양성 그리고 활성도 등의 변화는 오염물질의 처리 정도, 처리부지의 적합성 결정 등에 중요할 뿐만 아니라 처리의 규모확대나 감시관리에도 중요하게 이용될 수 있다(6). 그러나 이런 영향에 대한 연구는 그다지 많지 않으며 또한 명확한 결론이 나있지 않은 형편이다. 더우기 이에 관한 연구중 상당수가 수서 환경에서의 PHC 분해미생물 또는 배양가능한 종속 영양미생물의 개체수 측정에 관한 보고들이며 토양에서의 연구는 그 수가 적은 편이다(15).

이제까지 보고된 토양에서의 PHC의 영향은 일반적으로 탄화수소 분해미생물들과 배양가능한 종속 영양미생물의 개체수가 급증하며 여러가지 방법에 의한 미생물 활성도 증가한다는 것이었다. 또한 PHC의 효율적인 제거를 위한 생물학적인 방법으로 bioremediation을 실시할 수 있는데 오염된 토양에서

pH 조절, 영양염류 투여와 토양경작으로 이루어진 토양처리법(landtreatment)을 실시할 경우에는 더욱 높은 미생물군의 증가를 보였다(14, 17, 20). 또한 여러 연구자들이 호흡율(산소 소모 또는 이산화탄소 방출), 포도당 등의 기질을 이용한 종속영양 활성도, 또는 다른 종류의 특정대사율 등을 측정하였으나 그 결과는 매우 상이하였다(5, 7, 8, 10, 14, 15). 더우기 토양에서의 미생물 활성도에 미치는 PHC의 영향에 대해서도 연구보고가 적은 편이며 이들중 대부분이 aerobic heterotrophic processes에 국한되어 있고 개체수와 의 관계도 명확하지 않았다(15). 한편 여러 환경요인들이 PHC에 의한 영향에 변화를 줄 수 있으며 미생물 활성도 측정에 공통적으로 사용되는 parameter도 아직 존재하지 않고 있다.

본 연구에서는 Song과 Bartha(20), Song 등(21)의 jet fuel에 의한 토양 미생물군집의 영향에 대한 연구에서 불분명했던 토양미생물의 개체수와 활성도와 의 관계, 미생물의 활성도와 탄화수소 잔류량과의 관계, 배양후기의 탄화수소 농도와 개체수와 의 관계 등을 조사하였으며 개체수와 활성도의 변화가 다른 종류의 PHC 즉 경유(diesel oil)에 의해서 어떤 영향이 어느 정도로 일어날 수 있는지 조사하였다. 또한 PHC를 처리하지 않았을 경우의 개체수 증감현상 및 landtreatment시 초기의 개체수 증가 등에 대한 변화 양상을 조사하였다. 또한 미생물 개체수와 활성도 사이의 관계가 제트유를 처리한 토양에서의 fluorescein diacetate (FDA) 가수분해 활성도 측정에서는 정확히 일치하지 않았는데 다른 종류의 PHC와 토양에서 같은 현상이 일어나는지 확인하고 토양미생물

활성도 측정에 흔히 사용하는 대표적 토양효소인 dehydrogenase activity 측정을 통해 PHC에 의한 토양미생물 활성을 측정하였다. 이러한 연구를 통해 토양, 또는 해변이나 sediment를 오염시킨 PHC에 의해 미생물군집이 어떻게 변화하며 개체수와 활성도가 어떤 조건에서 증가하는가를 알아내어 오염된 탄화수소를 효율적으로 제거시키는 방법을 찾아내고자 하는 것이 본 연구의 궁극적인 목적이다.

재료 및 방법

토양시료 채취 및 분석

실험에 사용한 토양은 강원대학교 부지내의 지역에서 표층토를 삽을 이용하여 채취하였는데 실험 때마다 새로운 시료를 채취하여 이용하였다. 표층의 큰 식물성 잔류물들을 제거하고 채취한 토양시료를 먼저 2 mm dia.의 sieve로 거른 후 토양 특성을 조사하기 위하여 soil pH, 토양재질, 유기물량, 수분보유능, 건조중량 등을 Pramer와 Schmidt (16)의 방법으로 측정하였다. 또한 토양 pH 조절을 위해 필요한 calcium carbonate 양을 측정하기 위해 soil liming curve를 만들었다 (19).

탄화수소 분석 및 정량

경유를 첨가한 토양에서 탄화수소를 정량하는 방법은 다음과 같다. 먼저 토양시료 30 g을 동량의 sodium sulfate와 잘 섞은 후에 cellulose extraction thimble (Whatman)에 넣고 methylene chloride를 첨가하여 6시간 동안 soxhlet extraction을 이용하여 석유탄화수소를 추출하였다. Rotary evaporator에서 농축하고 최종 부피를 확인한 후에 추출시료 10 ml를 vial에 넣고 정량시 보정을 위한 internal standard로 dichlorobenzene을 10 μ l 첨가하였다. 이렇게 준비된 시료를 gas chromatography/flame ionization detector를 이용하여 탄화수소를 정량하였다. 사용한 GC는 Varian Vista 6000이었고 column은 SPB-5 (Supelco)를 이용하였다. Carrier gas는 He (30 ml/min)를 사용하였고 수소와 공기의 flow rate는 각각 40 ml/min, 200 ml/min이었다. 탄화수소 분석에 이용되었던 온도 조건은 injector 250°C, detector 300°C, initial temp. 40°C, initial hold time 5 min, rate 15°C/min, final temp. 290°C, final hold time 7 min로 설정하였다.

Soil incubation systems

PHC 분해에 큰 역할을 하는 호기성 미생물들에 미치는 영향을 보기 위하여 aeration 및 tilling을 쉽게 할 수 있는 beaker에서 토양을 배양하였다. 600 ml beaker에 80 g의 토양을 넣은 후 각각 1, 5, 10, 20% (w/w)의 경유를 주사기로 고루 주입하였다. 경유가 capillary action에 의해 토양에 잘 확산되게 한 후 토양 수분함량을 수분보유능 (water holding capacity, WHC)의 50%가 되게 주사기로 고루 주입하였다. 이때 bioremediation 처리 비교를 하기 위해 replicate

sample을 준비하여 pH 조절, 영양염류 투여와 토양 경작으로 이루어진 landtreatment를 실시하였다. 이를 위해 먼저 CaCO₃로 soil pH를 7.5~7.8 정도로 맞추고 N (60 μ mol of N as NH₄NO₃/g soil), P (5 μ mol of P as K₂HPO₄/g soil)을 공급하며 배양기 간중 stainless steel wire를 이용하여 주기적으로 토양을 섞었으며 탄화수소의 손실을 막기 위해 wire는 beaker내에 잔류시켰다. 배양온도는 PHC의 영향을 쉽게 보기 위하여 27°C로 하였다. 대조구 시료는 sieved soil에 수분만 공급한 후 그대로 27°C에서 배양하였다.

토양미생물 개체수 측정

일정 배양시간 후 토양의 일부를 채취하여 그 중 1 g (wet weight)은 건조중량 (dry weight) 측정을 위하여 drying oven (105°C)에서 24시간 건조시킨 후 desiccator에서 식히고 무게를 측정하였으며 모든 실험결과는 토양 건조중량으로 표시하였다. 10 g (wet wt)의 토양시료를 60 mM phosphate buffer (pH 7.5)에 넣고 blender (Oster Corp.)에서 15,000 rpm으로 2분간 섞어 토양현탁액을 만들었다. 이것을 60 mM phosphate buffer로 serial dilution한 후 개체수 측정에 이용하였다.

FDA 직접계수는 다음과 같이 실시하였다. 적절한 희석배수의 토양 현탁액 1 ml를 4 ml의 phosphate buffer에 넣고 FDA stock solution (2 mg/ml acetone)을 넣어 최종농도가 10 μ g/ml가 되게 한 후 잘 흔들어 섞는다. 3분간 염색한 후 토양 현탁액을 black Nuclepore polycarbonate filter (25 mm dia., 0.2 μ m pore size)로 여과한 후 형광현미경 (Reichert Jung)으로 active bacterial population을 세고 동시에 ocular micrometer를 이용하여 균류의 균사 길이를 측정하였다. 이때 적어도 10개 이상의 현미경 시야를 관찰한 후 개체수와 균사 길이를 계산하였다.

호기성 종속영양세균 측정은 적절한 희석배수의 토양현탁액 1 ml를 멸균된 petri dish에 주입한 후 20 ml의 45°C로 식힌 멸균된 plate count agar (Difco) medium을 넣어 잘 흔들어 섞는 주입평판법을 이용하였다. 보다 많은 토양미생물의 계수를 위해 soil extract (16)를 배지 만드는데 증류수 대신 사용하였다. 접종 후 7일간 배양한 후 colony counting을 하여 개체수를 계산하였다.

탄화수소 분해세균의 개체수 측정은 MPN 방법을 이용하였는데 5 ml의 멸균된 Bushnell-Haas broth medium (Difco)에 토양현탁액을 각각 1, 0.1, 0.01 ml를 접종한 후 여과멸균된 50 μ l의 diesel oil을 유일한 탄소원으로 넣어주었다. 이때 배지에는 redox dye인 resazurine을 1 mg/l로 넣어서 미생물에 의한 PHC 산화의 결과로 resazurine이 환원되면 배지가 무색에서 pink색으로 변하므로 미생물 생장에 의한 양성 반응을 쉽게 확인할 수 있었으며 MPN index를 이용하여 탄화수소 분해세균의 개체수를 계산하였다 (3).

Table 1. Characteristics of soil employed in this study.

Soil	Source	Texture (%)			Organic Matter (%)	pH (g H ₂ O/g soil)	WHC
		Sand	Silt	Clay			
sandy loam	Kangwon University area	76	7	17	3.35	4.69	0.45

Table 2. Change of soil pH with calcium carbonate.

CaCO ₃ (mg/10g soil)	Soil pH					
	0	25	50	100	200	300
Soil pH	4.69	5.71	6.68	7.59	7.85	7.92

토양미생물 활성도 측정

FDA 가수분해를 이용한 토양의 total microbial activity 측정방법은 다음과 같다. 1 g (wet wt)의 토양시료를 50 ml의 phosphate buffer (60 mM, pH 7.6)에 넣고 FDA stock solution (2 mg/l acetone)을 넣어 최종 농도가 20 µg/ml이 되게 한 후 200 rpm에서 1시간 진탕하였다. 50 ml의 acetone을 넣어 반응을 정지시키고 6,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 Whatman No. 3 filter paper로 여과하였다. 여과된 filtrate를 분광분석기로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다(18).

토양에서의 미생물 활성도 측정에 널리 사용되는 dehydrogenase assay는 sensitivity가 높은 INT[2(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride] assay를 이용하였다. 토양시료 10 g (wet wt)에 0.4% INT solution 0.2 ml를 넣고 멸균 증류수로 토양의 수분보유능의 100%로 맞춘 후 27°C에서 48시간 배양하였다. 배양 후 10 ml methanol을 넣고 vortex mixer로 1분간 격렬히 섞은 후 Whatman No. 5 filter paper로 여과하였다. 환원된 INF (iodonitro-tetrazolium formazan)을 분광분석기로 485 nm의 파장에서 측정을 한 후 표준곡선을 이용하여 formazan 양을 계산하였다(23, 24).

결과 및 고찰

토양의 특성

실험에 적합한 지역을 골라 토양을 채취하여 기본적인 성질을 조사하였다. 선정된 지역은 강원대 부지내의 석유탄화수소에 의한 오염의 역사가 없으며 주변에 나무가 많은, 사람의 접근이 거의 없는 평지이다. 이 토양의 조성은 sand 76%, silt 17%, clay 7%로 토양재질로 볼 때 sandy loam에 속하는 종류인데 상당히 sand 성분이 많아서 loamy sand에 가까운 성질을 보인다(Table 1). 토양유기물은 주변의 교목들로부터 유입된 식물 잔류물의 영향으로 3.35%의 약간 높은 유기물량을 나타냈다. 그러나 강우에 의한 유실과 soil texture로 인해 humus 성분은 그

다지 많지 않고 비교적 큰 식물성 잔류물들이 많아 이 토양은 비옥한 편이 아니었다. 토양의 수분보유능(WHC)은 높은 sand 성분 때문에 그다지 높지 않아서 0.45 g/g soil (dry wt.) 이었으며 실험기간중 토양수분량은 0.10~0.14 g/g soil 로 WHC의 20~30% 수준에서 변화하였다. Soil pH는 4.69 (soil : distilled water=1 : 1)로 산성토인 것으로 나타났다.

이 토양의 pH를 생분해에 적합한 약알칼리성 토양으로 전환시키는데 필요한 calcium carbonate의 양을 측정하기 위하여 soil liming curve를 만들었다. 이 liming curve에 따르면 토양미생물의 활성에 적합한 pH 7.5~7.8 정도의 유지에 100 mg CaCO₃/10 g soil 정도가 첨가되어야 하는 것으로 나타났다(Table 2).

경유 잔류량 변화

토양 시료에서 경유(diesel oil)의 잔류량 변화 양상을 보면(Fig. 1) 상당한 기간이 경과해도 비교적 많은 양의 탄화수소가 잔류하는 것을 알 수 있다. 1%를 첨가했을 경우에는 16주 후 약간 적은 양이 남지만 loading rate가 5~20% 경우에는 약 50% 내외의 잔류량을 보였는데 이 차이는 증발의 차이와 탄화수소의 생물저해효과 때문인 것으로 추정된다. 석유탄화수소의 생분해에 미치는 여러가지 환경요인의 영향에 대해서는 이미 많은 연구가 있었으며 토양에서 탄화수소의 생분해를 극대화하기 위해 일반적으로 pH 조절, 적정 영양염류의 투여, 통기를 동시에 실시한다(19). 본 실험에서는 이런 처리가 미생물군집에 미치는 영향을 보기 위하여 탄화수소의 loading rate만을 달리해서 bioremediation 처리를 하였다. Bioremediation 처리를 할 경우에는 약 4주까지는 처리하지 않은 시료와 큰 차이가 나지 않으나 그 후 생분해가 가속화되어 16주째에는 약 10~20% 정도만이 잔류하게 되는데 잔류량은 loading rate가 높을수록 높은 수치를 보인다. 배양 초기에는 경유내의 휘발성 탄화수소 성분이 신속하게 토양에서 제거되고 이 때에는 생분해가 그다지 크게 작용하지 않으며 또한 탄화수소 분해미생물 및 다른 중속영양 미생물들이 탄화수소에 적응하기 때문에 이런 제거양상이 나타난다(21). 약 4주 후부터는 bioremediation 처리 시료에서 증가되고 적용된 미생물군집에 의해 탄화수소가 활발히 분해되어 처리하지 않은 시료와 차이를 나타낸다. 16주째의 잔류량을 토양으로부터 제거된 탄화수소의 양으로 환산한 것이 Table 3에 나와 있는데 이 수치를 보면 탄화수소 농도가 높거나 낮을 때에는 bioremediation에 의해 큰 차이가 나지 않

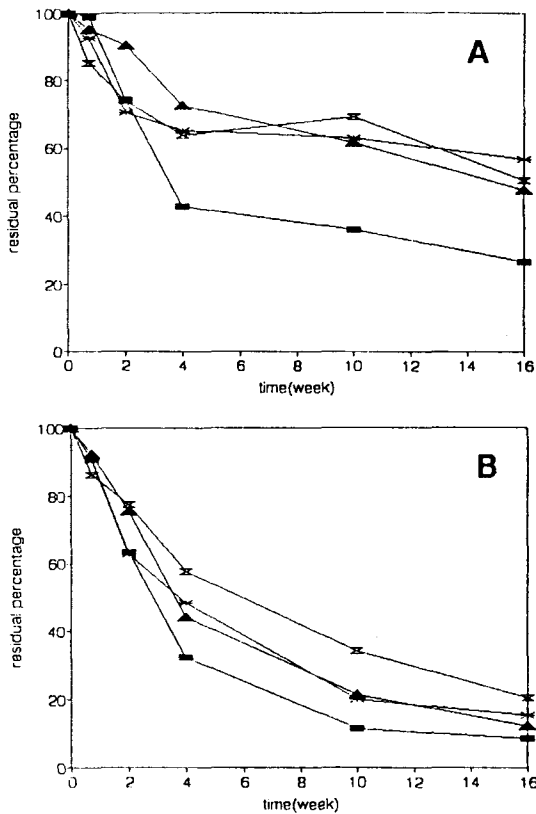


Fig. 1. Disappearance of diesel oil from untreated samples (A) and bioremediation-treated samples (B).
 ■—■, 1% loading rate; ▲—▲, 5% loading rate; *—*, 10% loading rate; □—□, 20% loading rate.

으나 10%의 loading rate에서는 실제로 제거된 양이 bioremediation 처리 시료에서 거의 2배가 된다는 것을 볼 수 있다. 일반적으로 토양에서의 탄화수소의 생분해에 적합한 농도는 5~10%라고 알려져 있으나 종종 그 이상의 농도에서도 생분해가 잘 일어난다는 보고도 있었다 (15, 19). 본 실험의 sandy loam에서도 10%의 농도에서 가장 높은 제거율의 증가가 나타났으며 한편 loading rate를 20%까지 올렸을 때에도 생분해는 계속 증가해서 10% 농도 때보다 제거효율은 약간 낮지만 제거된 탄화수소량은 오히려 더 높았다. 따라서 이러한 잔류량의 변화를 볼 때 제거된 탄화수소는 미생물의 생장에 상당량 이용되었을 것으로 추정되며 또한 bioremediation 처리를 한 시료에서는 하지 않은 시료보다 높은 미생물 개체수와 활성도를 보일 것으로 예상되었다.

한편 본 실험에 사용한 경유의 탄화수소 성분은 탄소수가 9개부터 약 20개까지의 포화지방족 탄화수

Table 3. Removal of diesel oil from soil during a 16 week incubation period at 27°C.

Loading rate (%)	Time 0 concentration (mg/g soil)	Removal (mg/g soil)	
		Untreated sample	Treated sample ^a
1	10	7.4	9.1
5	50	26.3	43.9
10	100	43.5	84.6
20	200	99.6	159.0

^abioremediation-treated soil sample

소가 주성분으로 탄소수 9~15개의 분포를 보이는 제트유보다는 기질로서의 이용의 용이성이 약간 떨어지나 상당히 좋은 탄소원으로 작용할 수 있었다.

토양미생물 개체수에 미치는 영향

본 연구에서는 토양미생물 군집의 동향을 파악하기 위한 한 가지 방법으로 형광염료인 fluorescein diacetate (FDA)를 이용하였는데 FDA 염색방법은 세균이나 균류의 염색에 이용되어 오던 방법으로 (12, 22) 토양에서 활발히 대사를 하는 미생물들만이 FDA를 가수분해하여 fluorescein을 세포내에 축적하기 때문에 제트유에 오염된 토양에서 FDA 직접계수 방법을 이용하여 세균과 균류를 측정할 바 있다 (20). 직접계수시 종래에 이용하던 형광염료들은 증식하는 세포 뿐만 아니라 휴지기 세포와 죽은 세포까지도 염색하였기 때문에 실제로 살아있는 정확한 개체수의 판별이 어려웠으나 FDA 직접계수는 토양에서 대사활성을 갖고 있는 미생물만 측정할 수 있는 좋은 방법이 될 수 있다. 또한 FDA 가수분해는 total microbial activity 측정에도 이용할 수 있어서 (18) 이 방법을 Song과 Bartha (20)가 제트유에 오염된 토양에서 total microbial activity 측정에 이용하였다.

먼저 FDA 직접계수결과를 보면 (Fig. 2) 탄화수소를 첨가하지 않은 대조구 시료에서 배양 개시 후 약간의 개체수 증가를 나타내며 bioremediation 처리를 한 control 시료와 큰 차이를 보이지 않고 있다. 이러한 개체수 증가 현상은 토양시료 준비과정에서 sieving, rewetting을 통해 토양미생물에 공기과 수분 및 용해된 토양 유기물이 제공되어 나타난 것으로 Lund와 Goksoyr (11)도 토양시료에서 5~10 일 사이에 직접계수의 5~6배 증가를 보고한 바 있다. 본 실험에서는 이보다 약간 더 높은 증가율을 나타냈다. 경유의 첨가시에는 높은 개체수의 증가를 나타내어 2주째에는 10% loading rate의 bioremediation-untreated sample에서 최고 40배의 증가를 나타냈다. 경유 잔류량의 감소에 따라 2주 후에는 개체수가 서서히 감소하여 16주에는 원래의 상태로 돌아온다. Bioremediation 처리를 한 시료에서는 증가폭이 더 높아지며 약 4주까지 높은 개체수를 유지하며 10주 이후에 감소하는 경향을 보인다. 대체로

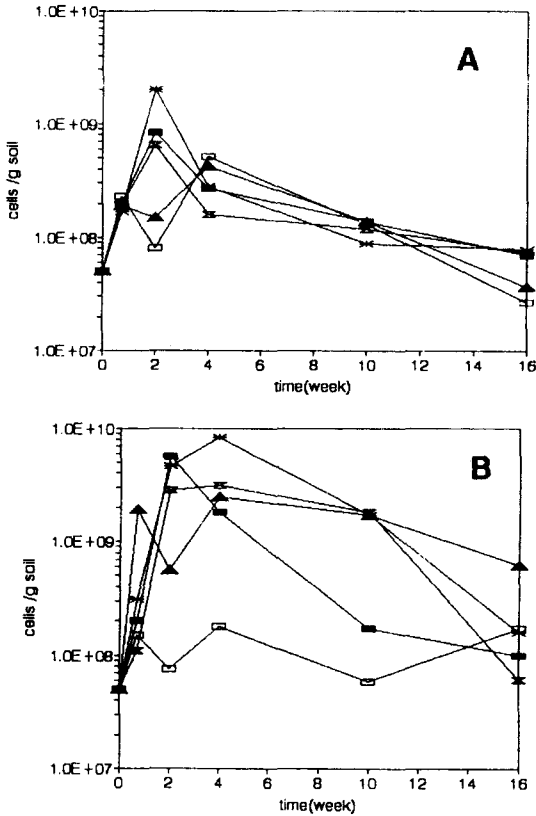


Fig. 2. Effect of diesel oil on FDA direct bacterial count in untreated samples (A) and bioremediation-treated samples (B).
 □—□, control; ■—■, 1% loading rate; ▲—▲, 5% loading rate; *—*, 10% loading rate; □—□, 20% loading rate.

5~10%의 경유 loading rate에서 가장 높은 개체수를 나타내며 20%에서는 약간 낮은 수치를 보인다. 이러한 변화 양상은 대체로 제트유를 첨가한 loam soil에서의 경향과 유사하나 (20) 직접계수의 수치가 약간 낮고 또 그 증가폭은 그다지 높지 않았는데 그 이유는 석유탄화수소의 차이라기 보다는 토양특성 때문인 것으로 여겨지는데 본 실험에서 이용한 토양이 그다지 비옥하지 못한 sandy loam이기 때문인 것으로 추정된다.

FDA를 이용한 직접계수 방법에 의한 균류 균사 길이 측정 결과를 보면 (Fig. 3) 이것 역시 직접계수 계수와 유사한 경향을 나타냈는데 경유 첨가의 효과가 매우 뚜렷하게 나타났다. 1%의 경유 첨가시에는 약간의 증가가 일어나나 5~20% 첨가시에는 상당히 큰 증가가 일어났다. Untreated and treated control sample은 약간의 증가만을 나타내며 큰 차이를 보이지 않으나 경유를 첨가하면 약 2주부터는 상당한 증가가 일어나 4주 정도에 최고치를 나타낸다.

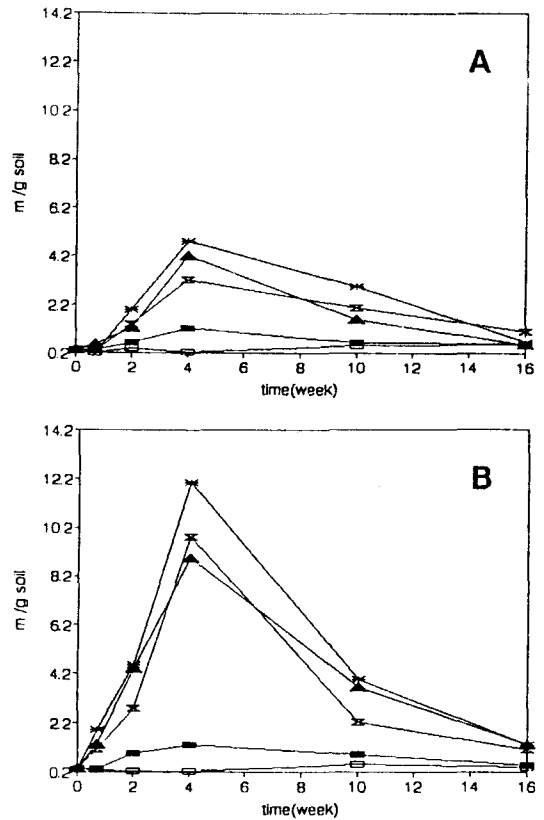


Fig. 3. Effect of diesel oil on fungal hyphal length in untreated samples (A) and bioremediation-treated samples (B). Symbols are as described in the legend of Fig. 2.

Bioremediation 처리를 할 경우에는 하지 않은 토양보다 2배 이상의 hyphae 길이가 관찰되었다. 10%를 처리한 시료에서 4주째에 12,060 mm가 가장 높은 수치였는데 이는 약 12 m/g soil로 제트유를 첨가한 loam soil에서 나타나는 수천 m/g 보다는 훨씬 낮았는데 그 이유는 토양 재질의 차이에 의한 것으로 추정된다.

평관계수법을 이용한 호기성 종속영양세균의 변화를 보면 (Fig. 4) 대조구 시료에서 약간의 증감을 보이는데 rewetting에 의해 용해된 토양 유기물 때문인 것으로 판단된다. 경유를 첨가한 untreated sample에서는 10배 또는 그 이상의 개체수 증가를 나타내고 있으며 bioremediation 처리를 할 경우에는 더욱 개체수 증가가 높아져 100배 이상의 증가가 일어나 약 10주 정도까지 유지되며 그 이후 서서히 감소한다. 배양 후반부에도 잔류하고 있는 탄화수소에 의해 상당히 높은 개체군이 유지되고 있다. 평관계수 수치가 16주째에 종종 직접계수보다 약간 높은 경우들이 있

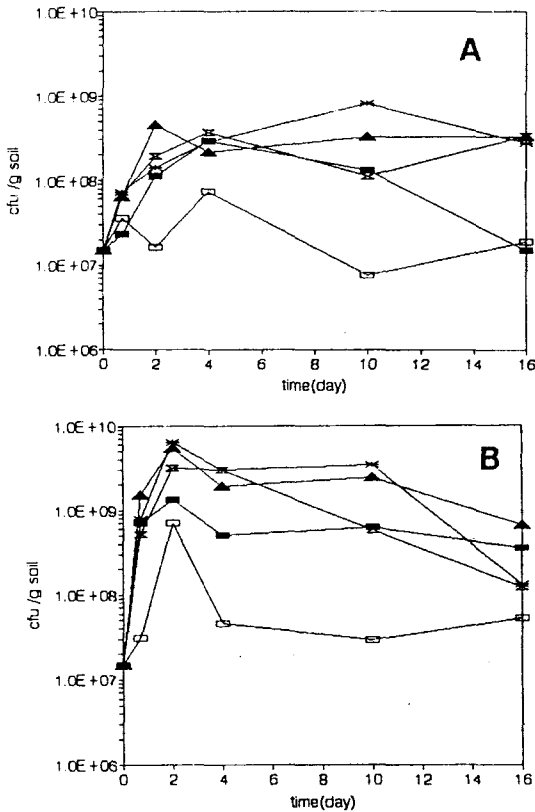


Fig. 4. Effect of diesel oil on aerobic heterotrophs in untreated samples (A) and bioremediation-treated samples (B). Symbols are as described in the legend of Fig. 2.

는데 그 이유는 평판계수에서는 휴지기 세포나 포자 등이 colony로 나타나며 반면에 FDA 직접계수에서는 대사활성이 활발한 것들만 계수되기 때문에 FDA 직접계수가 평판계수보다 낮을 수도 있다. 16주 정도에도 상당량의 탄화수소가 남아 있는데 거의 모든 개체수가 완만한 감소 경향을 나타내는 것은 짧은 사슬의 지방산같은 저해성을 가진 탄화수소 분해산물들의 축적 때문인 것으로 판단된다. 이런 물질들은 탄화수소가 많을 때에는 증가된 미생물 군집에 의해 완전히 분해되나 군집의 개체수가 떨어지면 완전히 분해되지 않고 저해효과를 나타내게 된다(2). 따라서 이러한 저해효과 때문에 미생물들의 대사가 활발하지 못하며 특히 16주째에 FDA 직접계수가 낮은 수치를 보인 원인인 것으로 판단된다.

탄화수소 첨가의 탄화수소 분해세균에 대한 영향은 다른 보고들과 마찬가지로 경유에서도 크게 나타나는데 2~10주 사이에 탄화수소 분해세균이 크게 증가하여 bioremediation 처리를 하지않은 토양시료의 경우 4×10^3 배 정도까지 증가하며 bioremediation

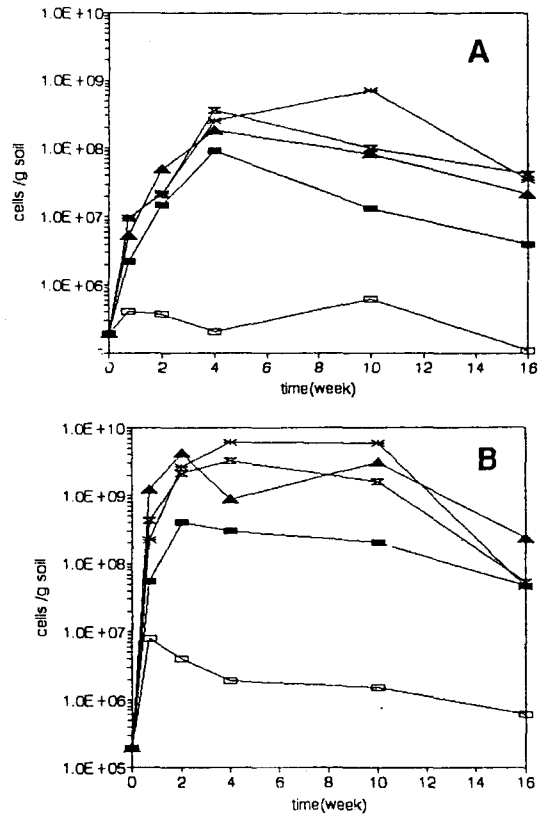


Fig. 5. Effect of diesel oil on hydrocarbon degraders in untreated samples (A) and bioremediation-treated samples (B). Symbols are as described in the legend of Fig. 2.

처리를 한 시료에서는 더욱 증가하여 3×10^4 배 까지 증가한 수치를 보인다(Fig. 5). 탄화수소의 loading rate는 1%일 때보다는 높은 농도에서 더 많은 개체수를 나타내는데 5, 10, 20% 간에서는 그다지 큰 차이를 발견할 수 없었다. 직접계수나 평판계수에서의 증가된 개체수는 주로 탄화수소 분해세균에 의한 것으로 배양 초기 이후에는 토양미생물 군집의 대부분을 이들이 차지하고 있다. 탄화수소 분해세균과 호기성 종속영양세균의 비율을 보면 거의 대부분이 50% 이상의 수치를 보이는데 Mulkins-Philips와 Stewart(13)는 탄화수소로 오염된 지역에서 이 비율이 100%까지 증가한다고 보고한 바 있으며 Atlas 등(1)은 오염된 지역에서 우점하고 있는 개체군은 높은 생리적 내성과 기질 이용율을 갖고 있다고 보고하였다. Loading rate가 1%일 때는 증가율이 약간 낮으며 5~20%는 거의 유사한 경향을 나타내고 있다. 탄화수소 분해세균의 증가와 개체수는 제트유가 loam soil에 첨가되었을 때의 10^6 배 증가와 10^{10} /g soil의 개체수(20)보다는 낮지만 다른 여러 연구 결과와 유사하거나

오히려 높았다 (15). 탄화수소 분해미생물의 개체수가 상기 연구 (20) 결과보다는 낮지만 탄화수소 제거율이 유사한 것은 본 실험에서 이용한 토양이 sandy loam으로 경작이 용이하고 공극이 커서 통기가 잘 일어나며 휘발성 탄화수소의 증발이 보다 쉽기 때문인 것으로 생각된다.

경유가 토양미생물 개체군에 미치는 영향을 전체적으로 보면 경유 첨가시 토양미생물 개체수의 증가를 가져오며 bioremediation 처리시에는 더욱 높은 증가를 나타내었다. 이는 경유가 상당 기간 토양내에 남아 있으면서 탄소원으로 제공될 수 있기 때문이다. 탄화수소의 농도는 5~10%일 때 가장 높은 개체수 증가를 가져오며 20%에서는 유사하거나 약간 낮은 수준의 증가를 나타냈다. 균사 길이를 제외하고는 나머지 개체수 측정치들은 배양 후기에 도달한 수준을 유지하고 있었는데 이것은 Song과 Bartha (20)의 결과에서 불분명했던 탄화수소 잔류량과 개체수와의 관계를 보다 정확히 나타낸 결과가 된다. 석유 탄화수소로 오염된 지역에서 이렇게 증가된 탄화수소 분해세균과 기타 종속영양미생물들에 의해 탄화수소가 생분해되는데 그 증가율이 크기 때문에 Bunker C유나 특정 난분해성 탄화수소 성분이 높거나 이들만으로 구성되어있는 경우 등을 제외하고는 환경에 존재하고 있는 고유의 미생물들에 의해 대부분의 탄화수소가 제거될 수 있다. 물론 난분해성 성분의 분해를 촉진하기 위해서는 이를 분해하는 미생물들을 탐색하고 이용하는 방법이 계속 개발되어야 할 것이다. 최근에 Venosa 등 (25)은 시판되는 탄화수소분해 종균제보다 자연환경 고유의 미생물들이 원유의 생분해에 1차적으로 관여한다고 보고한 바 있다. 따라서 이런 고유 미생물들의 개체수와 활성도를 조사하고 그것을 최대한으로 증진시키는 것이 매우 중요한 문제가 될 수 있다. 탄화수소에 의해 이렇게 증가된 개체군은 경유의 bioremediation 처리의 적합성을 나타내는 것이 되며 따라서 Heitzer와 Sayler (6)가 지적한 바와 같이 탄화수소로 오염된 지역에서 미생물 개체군, 특히 분해미생물의 동향 파악은 오염물질의 처리 적합성 여부와 처리 진행정도를 알기 위한 monitoring에도 이용될 수 있다.

토양미생물 활성도에 미치는 영향

토양에서의 total microbial activity로 FDA 가수분해 활성도를 측정하였는데 FDA는 esterases, lipases, proteases 등 여러가지 broad-specificity enzymes에 의해 가수분해되며 분해산물인 fluorescein은 형광을 나타내므로 FDA 가수분해는 토양에서의 total microbial activity 측정에 사용될 수 있으며 (18) 탄화수소로 오염된 토양에서 미생물군집의 활성측정에도 이용되었다 (9, 20). 경유가 토양의 FDA 가수분해 활성도에 미치는 영향을 보면 (Fig. 6) bioremediation 처리를 하지않은 토양시료의 경우에는 일부의 시료에서 약간의 증가만을 나타내고 있다. Bioremediation 처리를 하지않은 시료에서의 이런 결과는 본

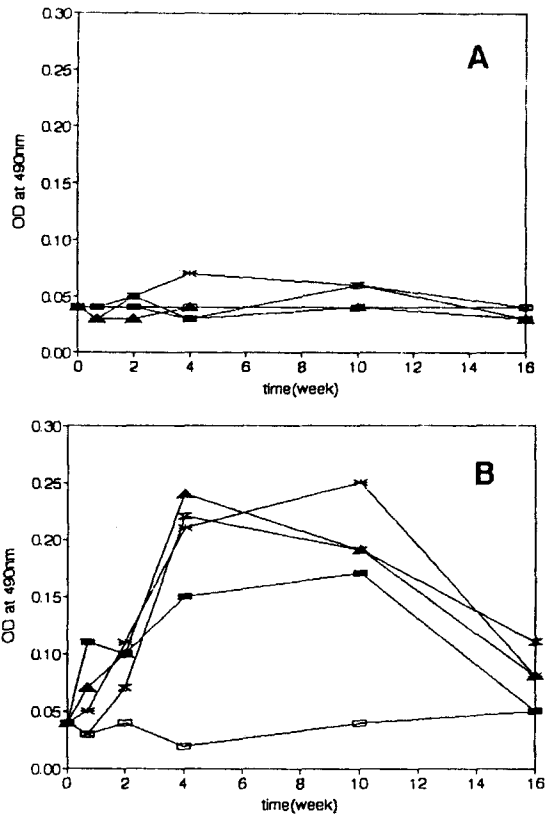


Fig. 6. Effect of diesel oil on FDA hydrolysis activity in untreated samples (A) and bioremediation-treated samples (B). Symbols are as described in the legend of Fig. 2.

실험에서의 개체수 증가 현상보다는 상당히 낮은 편이며 또한 제트유가 첨가된 untreated soil에서의 지속적인 감소와도 대조적이다 (20). 한편 이와는 상반되게 Kerry (9)는 untreated soil에서의 FDA 가수분해 활성의 지속적 증가를 보고한 바 있다. Song (19)은 미생물 개체수가 비교적 낮을 때에 탄화수소에 의해 FDA 가수분해 활성이 저해되는 것으로 설명하였으며 따라서 본 실험에서 사용한 토양에서는 이런 저해가 비교적 적은 것으로 추정할 수 있으며 이런 증감경향이 확실히 토양 특성차이에 의한 것인지는 다른 종류의 토양과 탄화수소를 이용해서 확인할 필요가 존재한다. Bioremediation 처리를 한 시료에서는 하지않은 시료에 비해 상당히 큰 FDA 가수분해 활성의 증가가 나타나는데 탄화수소 농도에 따른 증가율의 차이는 거의 없었으며 4~10주 사이에 가장 높은 수준을 유지하며 16주째에는 감소하였다. 이러한 증가 경향은 Song과 Bartha (20)의 결과와 다소 차이가 있는데 본 실험의 FDA 가수분해가 오히려 앞에 설

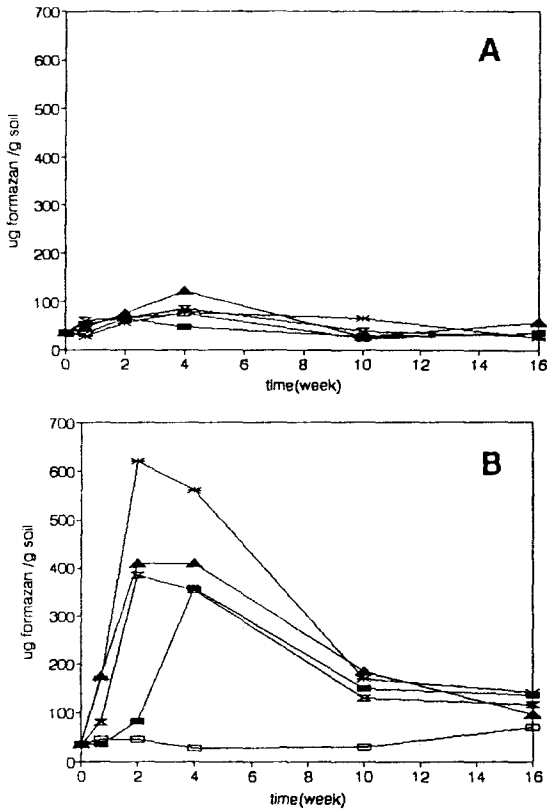


Fig. 7. Effect of diesel oil on dehydrogenase activity in untreated samples (A) and bioremediation-treated samples (B).

Symbols are as described in the legend of Fig. 2.

명한 본 실험에서의 다른 미생물 개체군의 변화 양상과 일치하는 결과를 나타내기 때문에 보다 정확한 total soil microbial activity를 나타낸다고 할 수 있다. 이런 일치하는 경향은 시간 간격을 좁혀서 다른 토양에서 다시 확인할 필요가 있다. 10주 이후의 활성의 감소는 FDA를 이용한 개체수 측정의 변화와 유사하게 저해효과를 반영한 것이다.

탈수소효소(dehydrogenase)의 활성은 토양 또는 다른 서식지에서의 미생물 대사활성의 측정에 흔히 사용되고 있다. Dehydrogenase 효소체체는 기질의 산화에 중요한 역할을 하는데 양성자와 전자를 기질로부터 전자수용체로 전달한다. 기질을 이용하여 호흡을 하는 미생물들은 모두 dehydrogenase 활성을 갖게 되며 따라서 total microbial activity 측정에 좋은 방법이 될 수 있으며 오염물질이 첨가되었을 경우에도 응용된다(4). 본 실험에서 토양의 dehydrogenase activity는 untreated control soil이나 bioremediation 처리를 한 control soil에서 모두 시간에 따른 약간의 변화를 보였는데 이것은 배양기간중 주

기적인 수분공급과 통기에 기인한 것으로 판단된다(Fig. 7). 경유가 첨가되었을 때에는 untreated soil에서 약간의 증가를 나타내어 2~4주에서 2배 이상의 activity 증가가 일어나며 10주 이후에는 다시 원상태로 돌아오는데 경유 loading rate에 의한 차이는 그다지 나타나지 않는다. Bioremediation 처리를 한 토양의 경우 다른 개체수나 활성도 증가와 같이 2~4주에서 10배 또는 그 이상 증가한 값을 나타내는데 이 때에도 탄화수소 농도에 의한 차이는 그다지 크지 않았다. 경유를 첨가한 bioremediation 처리 시료의 경우 비교적 큰 dehydrogenase activity의 증가를 보이는데 이는 경유가 미생물의 성장에 좋은 기질로 작용할 수 있기 때문이다. 본 실험에서는 Frankenberger와 Johanson(4)의 diesel fuel 실험보다 높은 수치를 보였는데 본 실험에서는 보다 낮은 농도의 탄화수소를 이용하여 탄화수소에 의한 저해효과가 낮았으며 측정효율이 높은 INT를 사용하였기 때문이다.

본 실험에서 경유에 의한 토양미생물 군집의 활성도에 미치는 영향은 개체수 변화와 상당히 일치하는 경향을 보였으나 그 증감폭은 개체수 변화보다는 작았다. 대체로 5~20%의 범위에서는 탄화수소의 농도에 의한 차이는 별로 나타나지 않았으며 전체적으로 비교할 때 bioremediation에 의한 영향이 예상보다는 작았다. 본 실험은 여러가지 요인을 비교해 볼 때 제트유를 첨가한 loam soil에서의 Song과 Bartha(20)의 연구결과보다 1/10 또는 그 이하 수준의 개체수와 활성도를 나타내고 있는데 이런 차이의 주된 원인은 토양 특성의 차이 때문이며 경유가 제트유보다 탄화수소가 더 많은 탄화수소 성분들을 함유하고 있으며 방향족 탄화수소의 구성비가 더 커서 기질로서의 용이성이 약간 떨어지는 것도 부분적인 이유가 될 것이다.

감사의 말

이 연구는 교육부 학술연구조성비(1991)의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. Atlas, R.M., A. Horowitz, M. Krichevsky, and A. Bej, 1991. Response of microbial populations to environmental disturbance. *Microb. Ecol.* 22, 249-256.
2. Atlas, R.M. and R. Bartha, 1973. Inhibition by fatty acids of the biodegradation of petroleum. *Antonie van Leeuwenhoek* 39, 257-271.
3. DiGeronimo, M.J., M. Nikaido, and M. Alexander, 1978. Most-Probable-Number technique for the enumeration of aromatic degraders in natural environments. *Microb. Ecol.* 4, 263-266.
4. Frankenberger, W. and J. Johanson, 1982. Influence of crude oil and refined petroleum

- products on soil dehydrogenase activity. *J. Environ. Qual.* **11**, 602-607.
5. **Griffiths, R.P., B.A. Caldwell, W.A. Broich, and R.Y. Morita**, 1981. Long-term effects of crude oil on uptake and respiration of glucose and glutamate in Arctic and Subarctic marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**, 792-801.
 6. **Heitzer, A. and G. Saylor**, 1993. Monitoring the efficacy of bioremediation. *Trends in Biotech.* **11**, 334-343.
 7. **Hersman, L.E. and D.A. Klein**, 1979. Retorted oil shale effects on soil microbial characteristics. *J. Environ. Qual.* **8**, 520-524.
 8. **Horowitz, A. and R.M. Atlas**, 1977. Response of microorganisms to an accidental gasoline spillage in an Arctic freshwater ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**, 1252-1258.
 9. **Kerry, E.**, 1993. Bioremediation of experimental petroleum spills on mineral soils in the Vestfold Hills, Antarctica. *Polar Biol.* **13**, 163-170.
 10. **Leahy, J.G. and R.R. Colwell**, 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* **54**, 305-315.
 11. **Lund, V. and J. Goksoyr**, 1980. Effects of water fluctuations on microbial mass and activity in soil. *Microb. Ecol.* **6**, 115-123.
 12. **Lundgren, B.**, 1981. Fluorescein diacetate as a stain of metabolically active bacteria in soil. *Oikos* **36**, 17-22.
 13. **Mulkins-Phillips, G.J. and J.E. Stewart**, 1974. Distribution of hydrocarbon-utilizing bacteria in northwestern Atlantic waters and coastal sediments. *Can. J. Microbiol.* **20**, 955-962.
 14. **Odu, C.T.I.**, 1978. The effect of nutrient application and aeration on oil degradation in soil. *Environ. Pollut.* **15**, 235-240.
 15. **Pfaender, F.K. and E.N. Buckley III**, 1984. Effects of petroleum on microbial communities, p. 507-536. In R. Atlas (ed.), Petroleum microbiology. Mcmillan Publishing Company, New York.
 16. **Pramer, D. and E. Schmidt**, 1964. Experimental soil microbiology. Burgess Publishing Company, Minneapolis.
 17. **Sandvik, S.A., A. Lode, and T.A. Pedersen**, 1986. Biodegradation of oily sludge in Norwegian soils. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 297-301.
 18. **Schnurer, J. and T. Rosswall**, 1982. Fluorescein diacetate as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 1256-1261.
 19. **Song, H.-C.**, 1988. Petroleum hydrocarbons in soil: Biodegradation and effects on the microbial community. Ph.D. thesis, Rutgers University.
 20. **Song, H.-G. and R. Bartha**, 1990. Effect of jet fuel spills on the microbial community of soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 646-651.
 21. **Song, H.-G., X. Wang, and R. Bartha**, 1990. Bioremediation potential of terrestrial fuel spills. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 652-656.
 22. **Swisher, R. and G.C. Carroll**, 1980. Fluorescein diacetate hydrolysis as an estimator of microbial biomass on coniferous needle surfaces. *Microb. Ecol.* **6**, 217-226.
 23. **Trevors, J.T.**, 1984. Dehydrogenase activity in soil: A comparison between the INT and TTC assay. *Soil Biol. Biochem.* **16**, 673-674.
 24. **Trevors, J.T., C.I. Mayfield, and W.E. Inniss**, 1982. Measurement of electron transport system(ETS) activity in soil. *Microb. Ecol.* **8**, 163-168.
 25. **Venosa, A., J. Haines, and D. Allen**, 1992. Efficacy of commercial inocula in enhancing biodegradation of weathered crude oil contaminating a Prince William Sound beach. *J. Ind. Microbiol.* **10**, 1-11.

(Received December 10, 1993)

(Accepted December 29, 1993)

ABSTRACT: Effects of Diesel Oil on the Population and Activity of Soil Microbial Community

Seo, Eun-Young and Hong-Gyu Song* (Department of Microbiology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea)

The effects of diesel oil on the microbial community in sandy loam soil were investigated, and the effects of bioremediation which was performed to enhance the removal of diesel oil from soil were also measured. The residual percentage of diesel oil was about 50% after 16 week incubation period. The bioremediation treatment increased the removal rate at 60~95%. When the soil was contaminated with diesel oil, the direct bacterial count, length of fungal hyphae, aerobic heterotroph and hydrocarbon degrader were increased by 2~3 orders of magnitude. The bioremediation further increased these numbers 10 to 100-fold. There were no definite patterns of change in fluorescein diacetate hydrolysis activity in bioremediation-untreated soil, but about 10 times of increase of activity was observed in bioremediation-treated soil. Similar change was occurred in soil dehydrogenase activity.